

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Nikola Dvořáková

Využití genomové editace k tvorbě velkých zvířecích modelů

Generation of large animal models using genome editing

Bakalářská práce

Školitelka: Ing. Zdeňka Ellederová, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 05. 2017

Podpis

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Zdeňce Ellederové, Ph.D. za trpělivost při opravování, za čas věnovaný mně a mé práci, a především za velmi cenné rady.

Poděkování patří také mé sestře, která vydržela mé neustálé dotazy ohledně bakalářské práce a pravopisných korekcí, a přesto mě stále psychicky podporovala. Díky také rodině a blízkým, kteří mě udržovali v pozitivním smýšlení.

Abstrakt

Principem genového inženýrství je zásah do DNA studovaného organismu. Po objevu programovaných endonukleáz došlo k velké expanzi této techniky a otevřely se možnosti pro tvorbu velkých zvířecích modelů, které bylo donedávna velice obtížné vytvořit. Mezi tyto endonukleázy patří zinc finger nuclease (ZFN), transcription aktivátor like effector nuclease (TALEN) a CRISPR/Cas9, ve kterém se dnes skrývá velký potenciál pro tvorbu velkých zvířecích modelů. Všechny endonukleázy vytváří místně specifický sestřih v požadovaném úseku genomu. Tento sestřih se nejsnadněji opraví pomocí připojení nehomologních konců (NHEJ), a tak lze vytvořit tzv. knock-out (KO) model. Druhým typem opravy je homologní rekombinace (HR) využívající DNA templát s homologními rameny. Pomocí toho lze vytvořit knock-in (KI) model, který bez specifických endonukleáz nebylo možné u velkých zvířecích modelů vytvořit díky nízké přirozené HR. Tato práce shrnuje historii, techniku a využití programovaných endonukleáz pro tvorbu velkých zvířecích modelů. Tyto modely mají velké využití v biomedicíně, jsou nezbytnou součástí preklinického výzkumu, ale jsou významné také v zemědělství, a dokonce i v ochraně prostředí.

Klíčová slova: velký zvířecí model, transgeneze, genomová editace, CRISPR/Cas9, TALEN, ZNF

Abstract

The principle of gene engineering is the intervention to the DNA of the studied organism. After the discovery of the programmed endonucleases, there has been a great expansion of this technique and it also accelerated the possibilities to create large animal models. Until recently, large animal models were very difficult to be generated. These endonucleases include zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator like effector nuclease (TALEN) and CRISPR/Cas9. All endonucleases produce locally specific splicing in the targeted segment of the genome. This splicing is most easily corrected by the non-homologous ends joining (NHEJ), so then it is possible to create a so -called knock-out (KO) model. The second type of repair is homologous recombination (HR) using a DNA template with homologous arms. This makes it possible to create a knock-in (KI) model that cannot be created without specific endonucleases in large animal models due to the low natural HR. This work summarizes the history, technique and the use of programmed endonucleases for the creation of large animal models. These models have a great use in biomedicine, mostly in preclinical research, they are also significant in agriculture and even in the environment protection.

Key words: large animal model, transgenesis, genome editing, CRISPR/Cas9, TALEN, ZNF

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK.....	7
2	ÚVOD.....	8
3	HISTORIE GENOVÉ MANIPULACE.....	9
3.1	Historie tvorby velkých zvířecích modelů.....	11
3.1.1	Tvorba za pomoci virů	12
3.2	Objevy restričních endonukleáz.....	13
4	TVORBA VELKÝCH ZVÍŘECÍCH MODELŮ.....	14
4.1	Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT).....	14
4.2	Mikroinjekce do zygot	15
4.3	Editace spermatogonií	16
5	MECHANISMUS ZING FINGER/ TALEN/ CRISPR-CAS9	18
5.1	Homologní rekombinace (HR) a nehomologní připojování konců (NHEJ)	18
5.2	Off-target.....	20
6	VYUŽITÍ CRISPR/CAS9 SYSTÉMU.....	20
6.1	Příprava endonukleázy	21
6.2	Příklady Knock – out (KO)	23
6.3	Příklady Knock – in (KI)	23
7	ZÁVĚR.....	24
8	SEZNAM LITERATURY	26

1 SEZNAM ZKRATEK

ALB	A lbumin
Cas9	CRISPR-associated protein-9 nuclease
CRISPR	C lustered R egularly I nterspaced S hort P alindromic R epeats
crRNA	CRISPR RNA
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (D eoxyribonucleic a cid)
DSBs	Dvou-řetězcové zlomy (D ouble s trand b reaks)
ESC	Embryonální kmenové buňky (E mbryonic s tem c ell)
GFP	Zelený fluorescenční protein (G reen f luorescent p rotein)
HPRT gene	H ypoxanthine- P hosphoribosyl- T ransferase gen
HR	Homologní rekombinace (H omologous r ecombination)
KI	K nock-in
KO	K nock-out
M II	M etafáze II
mRNA	Mediátorová RNA (M essenger r ibonucleic a cid)
MT-hGH	Metallothionein lidský růstový hormon (M etallothionein g rowth h uman h ormon)
NHEJ	Nehomologní připojení konců (N on- h omologous e nd j oining)
PAM	P rotospacer a djacent m otif
PCR	Polymerázová řetězová reakce (P olymerase c hain r eaction)
PET scan	Pozitronová emisní tomografie (P ositron e mission t omography s can)
rRNA	R ibozomální RNA
SCNT	Přenos jádra somatické buňky (S omaticcell n uclear t ransfer)
sgRNA	S ingle g uide RNA
SV40	S imian v irus 40
TALENs	Transkripci aktivující efektor nukleáza (T ranscription a ctivator-like e ffector n ucleases)
tracrRNA	T rans-activating crRNA
ZFNs	Zincfinger nukleáza (Z inc f inger n ucleases)

2 ÚVOD

Aby mohly být biologické experimenty využity v praxi, bylo potřeba zaměřit se na využití zvířat jako pokusných modelů. Na těchto zvířecích modelech je možné testovat výzkumné metody a sledovat výsledky, namísto využití lidských subjektů. Nejpoužívanějším savčím modelem pro biologický výzkum je stále model myši. Na myších byly uskutečněny první objevy, které následně spustily vlnu klinických testů. Ovšem model hlodavců je natolik odlišný od lidí, že pro některé poznatky a preklinické testy je třeba využít i organismy bližší člověku. Aby některé objevy na myších mohly být aplikovány na člověka, začali vědci pracovat také na velkých zvířecích modelech, které bylo ještě donedávna velmi těžké vytvořit. Díky těmto velkým modelům je umožněno lepší otestování účinnosti terapeutického postupu a snížení rizika možných nežádoucích účinků u člověka.

Nejpodobnějším zvířecím modelem člověka jsou subhumánní primáti. Jsou velmi podobní z biologického i behaviorálního hlediska. Jejich inteligence a vnímavost je také jedním z problémů studií. Souvisí s otázkou, do jaké míry je etické, dělat na tomto modelu pokusy. Dalším problémem jsou vysoké náklady na daný výzkum. Přestože se jedná o jeden z nejnáročnějších modelů z různých hledisek, výzkum na subhumánních primátech je žádaný (Phillips et al., 2014). Jako alternativa primátů se dnes často z velkých zvířat využívají prasata, kozy, ovce nebo například králíci. Jejich největší výhodou se skrývá v určité podobnosti s lidským organismem. Některé modely mají obdobnou tělesnou hmotnost, délku života, a také podobné složení stravy jako člověk. Oproti myším mají také podobný metabolismus a množství potomků. Myši jsou nedostatečný model pro některá lidská onemocnění, a proto nejsou příliš využívány na preklinické testy u určitých onemocněních (Kues & Niemann, 2011). Mezi další výhody velkých modelů spočívá možnost použití stejné zobrazovací techniky jako u lidí. Například se jedná o magnetickou resonanci, která nám detailně zobrazuje strukturu jednotlivých orgánů, aniž bychom museli zvíře usmrtit (Yun et al., 2011). Podobným příkladem je také pozitronová tomografie (PET scan) (Jødal, Nielsen, Afzelius, Alstrup, & Hansen, 2017).

Z velkých zvířecích modelů jsou velmi využívána prasata, která mají podobné fyziologické vlastnosti i anatomii člověka. Jejich mozek je podobně velký a gyrifikovaný jako mozek lidský s vysokým zastoupením bílé hmoty (Lind et al., 2007). Díky podobnostem nervového systému jsou ideálním modelem pro výzkum neurodegenerativních onemocnění jako je například Huntingtonova choroba (Rausova et al., 2017). Úspěšným testovacím modelem jsou také při řešení dysfunkce kardiovaskulárního systému a při xenotranplantacích (Swindle, Makin, Herron, Clubb & Frazier, 2012). V medicíně se též hojně používají pro výzkum kozy. Jejich nejvyužívanějším produktem je transgenní mléko, které se lehce

získává a je z etického hlediska dobře přijímáno lidmi. Jedním z prvních lidských proteinů živočišného původu je antithrombin, který napomáhá pacientům proti krevním sraženinám (Moura, Melo & Freitas, 2011).

Výhody testování na velkých zvířecích modelech nejsou pouze z hlediska medicínského, ale mají své uplatnění také v zemědělství či ochraně životního prostředí. Například mikroinjekování, stejně jako rozvoj genomové editace, umožnilo nárůst svalové hmoty a rezistenci vůči některým onemocněním u vybraných hospodářských zvířat. Další příklad poukazuje na využití v ochraně životního prostředí. Přidaný transgen ve slinných žlázách prasat, který exprimuje bakteriální fytázy, pomohl k výraznému snížení negativních vlivů na životní prostředí. Došlo k velkému poklesu fosfátů v jejich fekáliích a tím k menšímu znečišťování vodních toků (Laible, Wei & Wagner, 2015) (Golovan et al. 2001).

Využití genomové editace na tvorbu velkých zvířecích modelů má několik výhod. Jejich praktický význam se uplatňuje v medicínském výzkumu jak s využitím pro člověka (např. modelování lidských onemocnění), tak na ochranu samotných zvířat před různými onemocněními. Přestože ještě před několika lety byla práce na velkých modelech velmi náročná, dnes, díky pokročilým poznatkům o specifických endonukleázách, je jejich tvorba snadnější. V této práci se budu zabývat možnostmi tvorby velkých zvířecích modelů právě za pomoci specifických endonukleáz.

3 HISTORIE GENOVÉ MANIPULACE

Manipulace s geny začala již při domestikaci, kdy se lidé postupem času snažili vyšlechtit co nejlepší dobytek či zemědělské plodiny z hlediska produktivity. Šlo o cílenou manipulaci genů bez přírodního výběru. O princip této techniky se zajímal například Georg Mendel, dnes známý jako „otec genetiky“. Jako první popsal fungování genů v publikaci o rostlinách v roce 1865. Vše pečlivě studoval na fazolích, které se ukázaly jako ideální model (Radick, 2015). Na objevení deoxyribonukleové kyseliny (DNA) se ovšem čekalo ještě mnoho let. Když byla roku 1881 DNA popsána (Miary ellen jones, 1953), začalo pátrání po struktuře této jedinečné genetické informace. Roku 1953 vytvořil J. Watson společně s F.Crickem model struktury DNA. Pomocí rentgenového difrakčního obrazu rozeznali trojrozměrnou strukturu a určili, že DNA má dvoušroubovicový charakter (Watson & Crick, 1953). Tím se spustila vlna molekulárních objevů. Roku 1962 zcela objasnil W. Arber otázku, díky čemu je DNA bakteriofágu rozštěpena na fragmenty po přidání do jiného kmene bakterií. Byl to první objev enzymu zvaného restrikční nukleáza, která umí rozpoznat vlastní DNA od cizorodé. DNA jiného organismu je následně nukleázou štěpena ve specifických oblastech. Následně bylo objeveno několik typů restrikčních enzymů (Loenen, Dryden, Raleigh, Wilson & Murray, 2014). Arber vytvořil také myšlenku vzniku nástroje na cílené štěpení DNA (Arber, 1965).

Netrvalo dlouho a došlo k odhalení enzymu ligázy spojující molekuly či fragmenty DNA. Díky nim také dochází k opravě jedno vláknových zlomů, a tím k obnovení funkce DNA (Weiss & Richardson, 1967).

K velkému zvratu došlo roku 1972, kdy Paul Berg a jeho kolektiv vytvořili první rekombinantní DNA. Použili na to DNA Simian viru 40 (SV40), do kterého vmezeřili galaktózový operon *Escherichia coli* s některými geny fága lambda. Jejich hlavní výzkumná myšlenka byla, zda je možné takto upravené bakteriální geny vložit do genomu savčích buněk, tak aby tam mohly být exprimovány (Jackson, Symons, & Berg, 1972). Další velký objev na sebe nenechal dlouho čekat a hned další rok předvedli Herbert Boyer a Stanley Cohen první geneticky modifikovaný organismus. Podařilo se jim vytvořit *in vitro* funkční bakteriální plazmid, který byl dán do *E. coli*. Jeho funkčnost ověřili tím, že část nového segmentu měla rezistenci proti antibiotikům. Po začlenění plazmidu do genomu došlo k jeho přepisu a k zajištění odolnosti bakterie proti kanamycinu a tetracyklinu (Cohen, Chang, Boyer & Helling, 1973). Roku 1974 vyjmuli R. Jaenisch a B. Mintz myši blastocyst a mikroinjektovali do něj SV40. Blastocysty, které měly v blastocoelu virulentní DNA, byly opět vráceny do dělohy. Úspěch tohoto pokusu, kdy se narodila infikovaná mláďata, byl cca 40 %. Šlo o první pokus na savčím organismu (Jaenisch & Mintz, 1974).

Již od prvního pokusu rekombinace a po několika následných významných pokusech se začalo uvažovat o možném zneužití. Proto P. Berg uspořádal roku 1975 konferenci v americkém Asimiloru. Byly pozastaveny veškeré experimenty, dokud se nesestavila pevná pravidla předcházející rizika. Došlo se k závěru, že by měla existovat přísná kontrola plánu experimentu, a to v takovém rozsahu, aby byla pokryta veškerá rizika. Také bylo potřeba zajistit biologickou bariéru. To znamená, že bakterie jako hostitel by neměla být schopná přežít ve volné přírodě a použitý vektor v experimentu by měl přežít jen ve specifickém hostiteli (Berg, Baltimore, Brenner, Roblin & Singer, 1975). Po konferenci byl opět veškerý výzkum spuštěn. Roku 1977 skupina vědců v čele s F. Sangerem osekvenovala první DNA. Byl to genom bakteriofágu phiX174, který odhalil své molekuly v devíti známých genech (Sanger et al., 1977).

Genentech byla první firma, která přišla s myšlenkou využívat rekombinaci komerčně. Založil ji Robert A. Swanson a Herbert W. Boyer v roce 1976 a funguje dodnes (<https://www.gene.com/>). Jedním z jejich prvních úspěchů bylo vytvoření lidského inzulínu pomocí *E. coli*. Uměle vytvořili geny pro lidský inzulin řetězce A a B, které poté vložili do beta-galaktózoového genu bakterie. Vytvořené proteiny se dále očistily a podrobily radioimunotestu, aby mohly být použity v dalším zkoumání (Göddel et al., 1979).

3.1 Historie tvorby velkých zvířecích modelů

První transgenní živočich byl vytvořen roku 1980 J. Gordonem a jeho kolektivem. Bylo to geneticky upravené myší embryo, kterému byla injektována cizorodá DNA přímo do prvojádra. Jednalo se o bakteriální plasmid, v němž byl inkorporován segment herpes simplex viru a SV40. Takto upravené embryo bylo zpět vloženo do náhradní matky. Výsledkem byla myš vykazující zařazení donorové DNA do genomu (Gordon, Scangos, Plotkin, Barbosa & Ruddle, 1980).

Postupem času se začalo přemýšlet nad potencionálním ekonomickým využitím při pokusech na velkých transgenních organismech. Proto se vědci rozhodli posunout oblast výzkumu i na hospodářská zvířata, například na králíky, ovce či prasata. V prvním pokusu byl mikroinjektován gen MT-hGH do pronuclea oplozených vajíček prasat a králíků (Hammer et al., 1985). Vytvořit velký transgenní organismus nebyl jednoduchý úkol, protože úspěšnost těchto pokusů byla velice nízká. U myších modelů snadněji dochází k homologní rekombinaci a tím se zvyšuje efektivita, protože nedochází ke ztrátě informace. U myší je dodnes všeobecně mnohem vyšší úspěšnost mikroinjekce a to i díky tomu, že hlodavci mají vyšší počet mláďat a mnohem častěji než zvířata velká. Bohužel u skotu byla úspěšnost manipulace s geny okolo 3 %. V důsledku jejich nízké reprodukční aktivity by bylo potřeba opravdu velké množství zvířat pro testování (Eyestone, 1994).

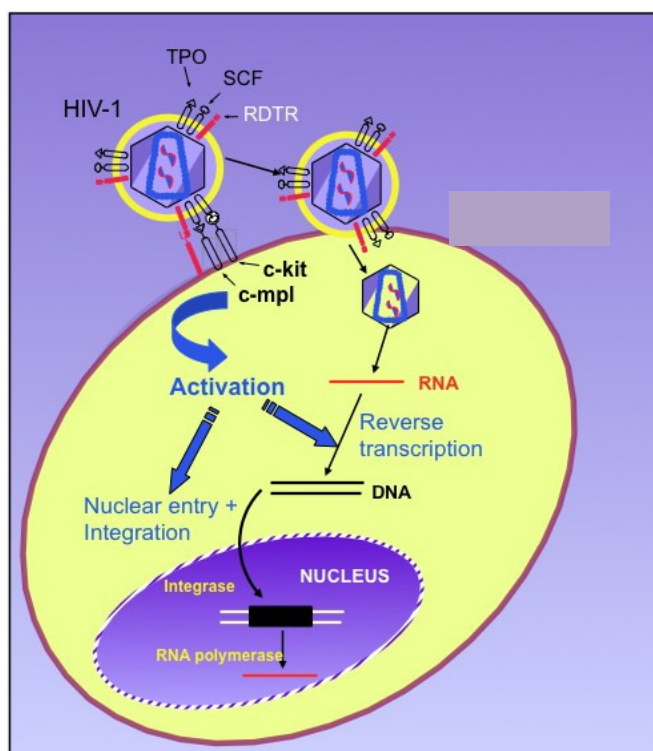
Taktéž roku 1989 přišel Mullis a jeho kolektiv s novou metodou syntézy specifické sekvence DNA – Polymerase chain reaction (PCR). PCR je kombinace molekulárního klonování a umožňuje nejen získat určité sekvence z velké molekuly DNA, ale také zvýšit počet specifíků pomocí primeru nebo vytvořit ze syntetizovaného fragmentu určitou sekvenci DNA (Mullis et al., 1986). Na tomto objevu se ovšem pracovalo řadu let, než došlo k jeho zveřejnění. Několik laboratoří také začalo pracovat na vyřazení určité genové sekvence u myši. Pro zastavení transkripce genu či určité sekvence použili homologní rekombinaci (viz. kapitola 5.1). V jednom z experimentů odstranili vědci mutaci v HPRT genu u embryonálních kmenových buněk, díky čemuž docílili snížení uracilu v krvi (Thompson, Clarke, Pow, Hooper & Melton, 1989).

Další velký zlom proběhl roku 1996, kdy se H. Campbellovi, J. McWhirovi a kolektivu povedlo přivést na svět první klonovanou ovci. Nejprve museli kultivovat somatické buňky, které poté přendali do oocyty bez jádra. Tato klonovaná ovce dostala jméno Dolly a stala se nejslavnější ovci na světě. Dokázalo se, že se somatické buňky dokážou přeměnit na totipotentní a dát tak vznik novému jedinci (Campbell, Mcwhir, Ritchie & Wilmut, 1996).

3.1.1 Tvorba za pomoci virů

Aby vědci potlačili nízkou efektivitu tvorby velkých transgenních zvířat, začali pro své pokusy využívat viry. Poměrně brzy bylo objeveno, že viry do cytoplasmy hostitelské buňky inkorporují mRNA, ze které pomocí vlastních reverzních transkripčních enzymů vytvoří DNA. Enzym integráza následně přenesení DNA viru do DNA hostitele. Buňka začne s transkripcí a následnou translací virové DNA. Na základě těchto znalostí o retrovirech byly vyvinuty retrovirové vektory. Ty umožňují připravenou mRNA vmezeřit do zvolené hostitelské buňky, pokud ponecháme viru jeho vlastní RNA nutnou pro vniknutí do buňky. Tím se podařilo zvýšit efektivitu přenosu genů oproti mikroinjekci. Jedním z nejpoužívanějších u velkých zvířecích modelů se stal lektinovirový vektor. Jeho výhoda spočívá v tom, že není závislý na dělení hostitelské buňky. Při vmezeřování virové DNA do DNA hostitele většinou nedochází u promotoru aktivních genů (Sheu et al., 2015).

Lektinovirový vektor byl poprvé použit na tvorbu transgenní myši (Jaenisch, 1976). Musí být ovšem vpraven do perivitelliního prostoru nebo musí být zygota zbavena všech vrstev, které by bránily snadnému přístupu do buňky. Úspěch přenosu transgenu je přibližně 95%, což je mnohem větší úspěšnost než u ostatních metod. Tento postup má ovšem i značné nevýhody. Lentivektor dokáže pojmout okolo 8 kb a tím dochází k omezení nemocí, které by mohly být zkoumány (Whitelaw et al., 2004). Dalším zásadním problémem techniky je vmezeření genu do DNA recipienta, kdy tento proces nejde nijak ovlivnit. Docházelo často k mutacím a umlčování oblasti důležitého genu pro buňku. Ve většině případů touto metodou vzniklo zvíře s mozaicismem. Nedochází tedy k expresi stejných genů ve všech buňkách, ale pouze v určitých částech těla (Kues & Niemann, 2011). Proto se postupně od této metody začalo ustupovat.



Obr.1: Vektor lentiviru se přichycuje na buňku pomocí receptorů. Následně svůj obsah přenesse do cytoplazmy hostitele. Zde je pomocí reversní transkriptázy vytvořená DNA, která je náhodně zabudována do DNA recipienta (upraveno z "CIRI", 2013).

3.2 Objevy restričních endonukleáz

Roku 1980 se týmy vědců po celém světě pustily do hledání vysvětlení molekulárních částí všech procesů v buňce. Jedním z úspěchů byl objev vlivu zinku na regulaci DNA vázaných proteinů a jeho funkce u faktoru A, objevený u *Xenopus laevis*. Transkripční faktor A je potřebný pro přepis části velké podjednotky ribozomální RNA (5S rRNA), ale bez vazby zinku by došlo ke špatnému nasednutí (Hanas, Hazuda, Bogenhagen, Wu & Wu, 1983). Při dalším výzkumu se zjistilo, že daný zinek nepatří ke struktuře faktoru A, nýbrž se jedná o zcela jinou molekulu jeho výskytu. Nyní je tato proteinová struktura známá jako motiv zinkového prstu (Zinc finger). Tato struktura má několik různých skupin, ale všechny nasedají na strukturu DNA a stabilizují ji (Klug, 2010). V návaznosti na tento objev vznikla myšlenka zefektivnění štěpení DNA na určité sekvence. Proto na dva různé motivy zinkových prstů připojili vědci doménu endonukleázy FokI, a tím došlo k vytvoření pozičně specifické endonukleázy, tzv. zinc finger nucleases (ZFNs) (Y. G. Kim, Cha & Chandrasegaran, 1996). Tím se zpřesnila tvorba dvouřetězcových zlomů (DSBs) na DNA.

S příchodem nového století byla popsána skupina transkripci aktivujících efektorů (TALEs) (Boch et al., 2009). Jedná se o DNA vázající doménu, která byla objevena u rostlinného patogenu rodu *Xanthomonas*. O rok později, roku 2010, přišel tým vědců z Minnesotské univerzity s nápadem připojit na TALEs nukleázu (TALENs). Použili k tomu již známou endonukleázu FokI. Díky repetitivním sekvencím TALEs vznikl restriční enzym mnohem

větší specifičnosti při dvouřetězcovém zlomu určitých sekvencí v DNA (Christian et al., 2010).

Dnes se často diskutuje o využití genomové editace za použití CRISPR/Cas9 systému. Jedná se o krátké palindromické repetice (CRISPR), které jsou pravidelně rozmístěny v DNA. K těmto úsekům jsou připojeny různé geny Cas, které disponují funkcí nukleázy a helikázy. S touto klasifikací a pojmenováním přišel Ruud Jansen se svými kolegy již roku 2002, kdy se začalo přemýšlet o jeho využití v biologii, a především v genetice (Jansen, Van Embden, Gastra & Schouls, 2002). Jejich objev byl uskutečněn u prokaryotických organismů. V jejich případě se jedná o formu „imunitního“ systému, který je chrání před cizorodou DNA. Určité typy Cas genů neprovádí štěpení cizorodé DNA, ale dokáží DNA naštěpit a zabudovat do vlastní DNA. Je to jeden ze znaků adaptivní imunity (Barrangou et al., 2007). Mezi vědci se stal tento typ připravované nukleázy velmi oblíbený díky jednoduchosti přípravy. Cas9 nukleáza, která je univerzální, je naváděna pomocí guide RNA udávající specifitu celého systému. To vše ovlivňuje také cenu přípravy, která je ze všech nukleáz nejnižší (Laible et al., 2015).

4 TVORBA VELKÝCH ZVÍŘECÍCH MODELŮ

Dnes dochází ke zdokonalování jednotlivých postupů pro tvorbu velkých zvířecích modelů. Hlavním cílem je zajistit co největší efektivitu tvorby. Přípravu velkých zvířecích modelů lze zajistit buďto postupem *in vitro* nebo *in vivo*. Při *in vitro* jsou vloženy geny z jiného organismu do kultivovaných buněk za laboratorních podmínek. Naopak při *in vivo* jsou cizorodé geny dány přímo do buněk hostitelského organismu.

Pro vytvoření velkých zvířecích modelů se nejčastěji využívá přenos jádra somatické buňky do enukleovaného oocyty. Další velmi využívanou metodou je mikroinjekce do zygoty. Obě metody přímo manipulují s jádrem oocyty. Vznik velkých transgenních modelů je nově uskutečňován i pomocí editace spermatogonií. Zde je vkládán velký budoucí potenciál pro snadné vytvoření modifikovaného zvířete.

4.1 Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)

Prvním velkým zvířetem, které vzniklo pomocí jádra ze somatické buňky, byla dnes nejznámější ovce Dolly. Podstata tohoto pokusu je známá spíše jako klonování (Campbell et al., 1996). Pro přenesení jádra somatické buňky (SCNT) je zapotřebí oplodněný oocyt. Somatická jádra jsou nejdříve upravena pomocí specifických endonukleáz, aby narozené zvíře mělo námi zvolené vlastnosti. Oocyty jsou odebírány z jatek nebo jsou získány po ovariální stimulaci zvířete. Následně jsou oplodněny postupem v *in vitro* podmínkách. Aby mohlo být vytvořeno embryo z jádra somatické buňky, je potřeba nejprve odebrat jádro

ze zygoty. Poté je jádro dárce přeneseno do enukleované zygoty a pomocí elektrické stimulace dojde ke spárování. Je ovšem zapotřebí, aby obě buňky byly v ideální fázi. Pro cytoplazmu oplozeného oocyty je to metafáze druhého meiotického dělení (MII), aby mohla následně buňka plynule přejít do fáze S. Pro somatické jádro je ideální fáze G0, aniž by se riskoval vstup do S fáze (Kato & Tsunoda, 2011)(Akagi, Matsukawa & Takahashi, 2014). Následně je takto vytvořená zygota inkubována do stádia několika buněk, než je přenesena do dělohy náhradní matky. Takto vzniklý potomek má stejnou genetickou výbavu jako dárce jádra somatické buňky.

Účinnost této metody nejspíše není ovlivněna výběrem somatických buněk. Používaným typem buněk jsou například fibroblasty (Kato & Tsunoda, 2011). Byla prokázána vyšší efektivita u buněk kultivovaných než u buněk odebraných přímo z recipienta (Akagi et al., 2003). SCNT má ovšem stále nízkou úspěšnost. Somatické jádro se těžce reprogramuje na totipotentní buňky (Kato & Tsunoda, 2011). Další problém je způsobený obtížným uchycením zygoty v děloze matky. Otázka spojená s dělením oocyty do vícečetných buněčných stádií embrya je řešena do určité míry pomocí přidání dalších embryonálních buněk (Akagi et al., 2014) (Buemo et al., 2016). Jiné pokusy zvyšují svoji úspěšnost pro SCNT díky dvojímu přenosu jádra (Irina A. Polejaeva*, Shu-Hung Chen*, Tod D. Vaught*, Raymond L. Page*, June Mullins*, Suyapa Ball*, Yifan Dai*, Jeremy Boone*, Shawn Walker*, David L. Ayares*, 2000).

Největší potenciál využití SCNT by byl ve využití embryonálních kmenových buněk (ESC) v terapeutickém klonování. Pro konkrétního pacienta by se vytvořily ESC se shodnou DNA, které by mohly pomoci vyléčit například některé degenerativní onemocnění jako je například Parkinsonova choroba (Tachibana et al., 2013). Z etického důvodu se ovšem od této metody opustilo. Dnes řada výzkumníků pracuje na vytvoření hybridního embrya, které by pocházelo ze dvou zcela odlišných druhů. Předpokládá se, že by se díky tomu dala zachránit zvířata na pokraji vyhynutí (Loi, Iuso, Czernik & Ogura, 2016).

4.2 Mikroinjekce do zygot

Upravování genomu zygoty se provádí pomocí přímého mikroinjekování specifických endonukleáz. Nejprve je potřeba získat oplozený oocyt, který je získán buďto *in vivo* nebo můžeme oocyt oplodnit *in vitro*. Následně je do jednobuněčné zygoty vpravena připravovaná nukleáza společně s vazebnou doménou, která slouží jako templát pro cílené dvouřetězcové zlomy. Následnou opravou dojde k vytvoření geneticky upravovaného potomstva. Nejčastěji se tato technika využívá u myších modelů, ale také u králíků (Flisikowska et al., 2011). U větších zvířat je stále více využívána SCNT technika. Oproti ní je ovšem mikroinjekce

do zygoty výrazně rychlejší než úprava somatického jádra a následného přenesení do bezjaderné embryonální buňky.

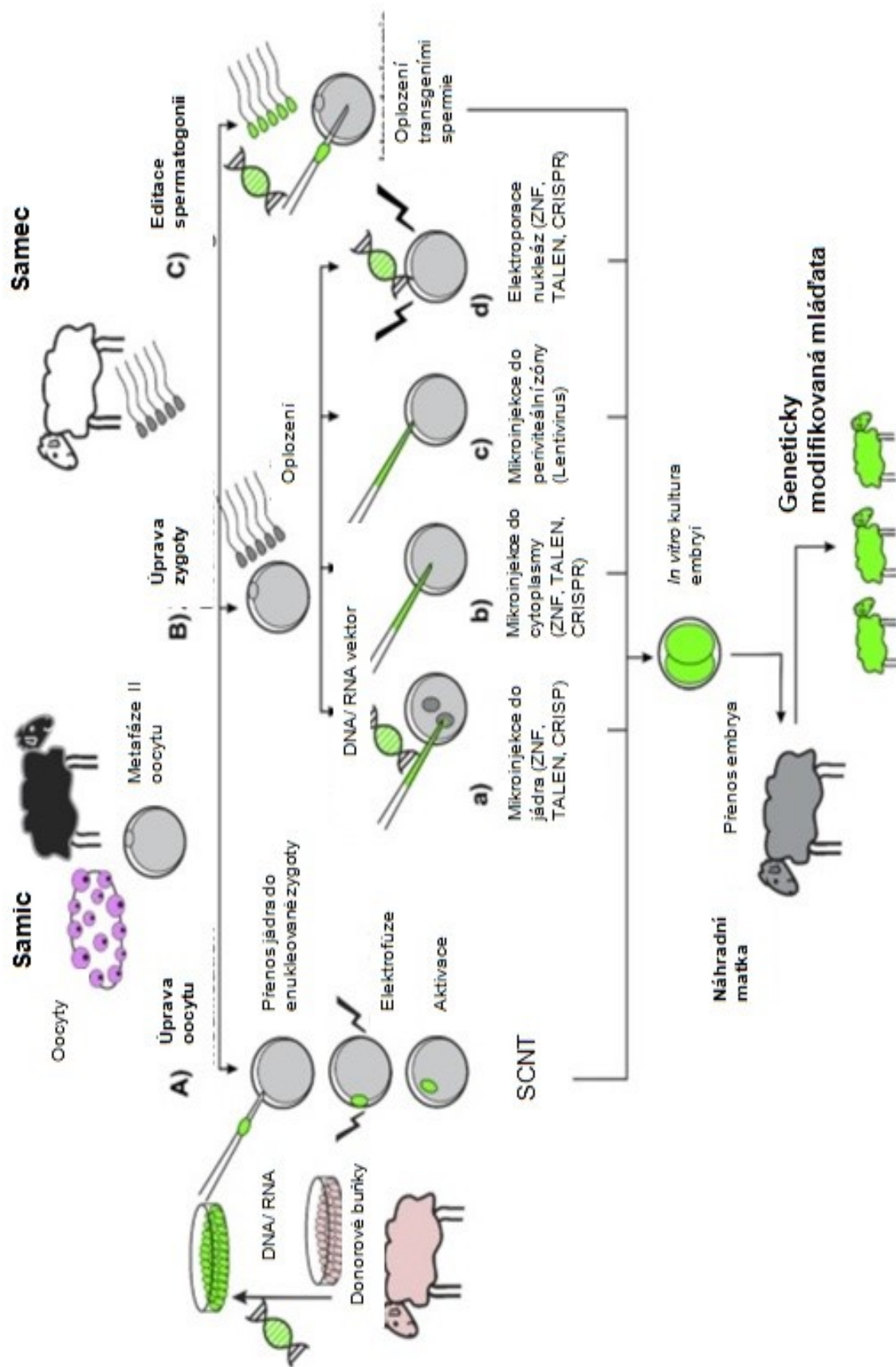
Aktivita specifických endonukleáz sebou přináší nevýhodu v podobě nehomologního připojování konců (NHEJ), které mohou za inzerční mutace (Lillico et al., 2013). Tím dochází ke snížení pravděpodobnosti požadovaného výsledku v embryu, a proto je potřeba velkého množství výzkumného materiálu. Dále je nutná optimalizaci stádia buňky, kdy by byla vhodná injekce do zygoty, na které se dnes již pracuje. Pro vytvoření homologních rekombinací (HR) se testuje ideální koncentrace a povaha cílové sekvence, která by sloužila jako homologní úsek k DNA hostitele. Ve srovnání s SCNT je mikroinjekování do zygoty nevýhodné z důvodu toho, že lze úspěch pokusu ověřit až po narození transgenních mláďat. Další problém je stejný jako v případě SCNT, kde dochází ke špatnému uchycení embryí v děloze náhradní matky (Park et al., 2017).

4.3 Editace spermatogonií

Editace spermatogonií je jednou z méně využívaných technik. Jedná se o mužské transgenní zárodečné kmenové buňky, které jsou unipotentní a ve varlatech se neustále obnovují za přeměny ve spermie. Úprava genetického materiálu u samčích gamet *in vitro* je možná pomocí virového vektoru, který zprostředkovává transdukci (Zeng et al., 2013). Dnes jsou již první pokusy na myších, kdy se místo virového vektoru používá programovaná endonukleáza CRISPR/Cas9 (Y. Wu et al., 2015). Následně jsou upravené samčí gamety zpět vráceny do varlat příjemce, kde se opět začnou vytvářet transgenní spermie. Těmi jsou následně oplozeny oocyty, které ponesou námi požadovanou úpravu genomu.

Editace spermatogonií má velký potenciál u velkých zvířecích modelů, kde ostatní metody nemají příliš velkou úspěšnost (Zeng et al., 2013). Osvojení této metody by mohlo být využíváno i na řešení některých lidských onemocnění, jako je například rakovina buněk. Tato metoda má ovšem i spoustu technických bariér. Spermatogonie upravené *in vivo* se chovají jinak v laboratorních podmínkách než ve varlatech recipienta (Yamada, Chiara & Seandel, 2016).

Obr. 2: Tvorba velkých zvířecích modelů (viz. str. 17) je možná pomocí 3 základních principů. Jedná se o techniku SCNT, kdy je do oplozeného oocyta recipienta vloženo jádro dárce. Dále jde o techniku přímého mikroinjekování nukleázy do zygoty. Zde je několik možností, kam specifickou nukleázu vložit. Poslední metoda manipuluje se spermatogoniemi. Transgenní spermie následně oplodní oocyt a tím vznikne geneticky modifikované zvíře (upraveno z Menchaca, Anegón, Whitelaw, Baldassarre & Crispo, 2016).



5 MECHANISMUS ZING FINGER/ TALEN/ CRISPR-CAS9

Ke genomové editaci dochází pomocí uměle připravovaných nukleáz. Ty jsou připojeny k proteinu, který slouží jako DNA vazebná doména. Přestože všechny typy endonukleáz fungují na obdobném principu, jejich vazebné motivy se liší, a proto je více či méně výhodné použít určitý typ specifické nukleázy pro různé pokusy. Specifičnost a afinita k cílovým částem DNA není u ZFNs natolik velká jako u ostatních nukleáz. Doména zinc finger váže převážně jen 3 bp DNA (Pavletich & Pabo, 1991) a tím nedochází k celkovému pokrytí všech možných kombinací tripletů. Úspěšnost se ovšem zvyšuje v oblastech DNA bohatých na guanin (Segal, Dreier, Beerli, Barbas & III, 1999).

Stejně jako ZFNs využívá TALENs endonukleázu FokI. Rozdíl je dán v jejich vazebné doméně. TALE doména obsahuje 33-35 aminokyselin, kdy 12. a 13. pozice aminokyseliny (Moscou & Bogdanove, 2009) určuje specifičnost navázání na samostatné nukleotidy DNA. Na druhé straně je problém velká velikost TALE domény. Snižuje se tím možnost využití u malých genomů, jako je například genom virů (Guilinger et al., 2015).

Třetím typem připravovaných nukleáz je CRISPR/Cas9. Oproti předchozím typům nukleáz je specifičnost u CRISPR/Cas9 zajištěna pomocí single guide RNA (sgRNA). SgRNA je chimerická RNA, která je složená z crRNA a tracrRNA a vytváří společně vlásenkovitou strukturu. CrRNA v přirozeném prostředí odpovídá protospaceru nacházející se mezi jednotlivými CRISPR částmi DNA a její velikost je 20 nukleotidů. Tuto část lze navrhnout podle námi vybrané cílové sekvence, kde se má uskutečnit DSBs. TracrRNA je obsažena v enzymu Cas9 a navazuje na crRNA. Mezi nimi je úsek zvaný PAM (protospacer adjacent motif) komplementární k cílové sekvenci DNA. Jeho velikost jsou 3 bp a nachází se zde místo stříhu (Jinek et al., 2012). Největší výhoda CRISPR/Cas9 systému spočívá v jednoduché manipulaci oproti TALENs a také v možnosti uchování stejné endonukleázy Cas9 i pro další pokusy (Ding et al., 2013) (Laible et al., 2015). Nevýhoda tohoto systému je ve větším počtu „off-target“ editací (viz. kapitola 5.2) (Cho et al., 2013), ke kterým přirozeně dochází. Dnes již mnoho laboratoří pracuje na potlačení těchto nežádoucích efektů (Sternberg & Doudna, 2015).

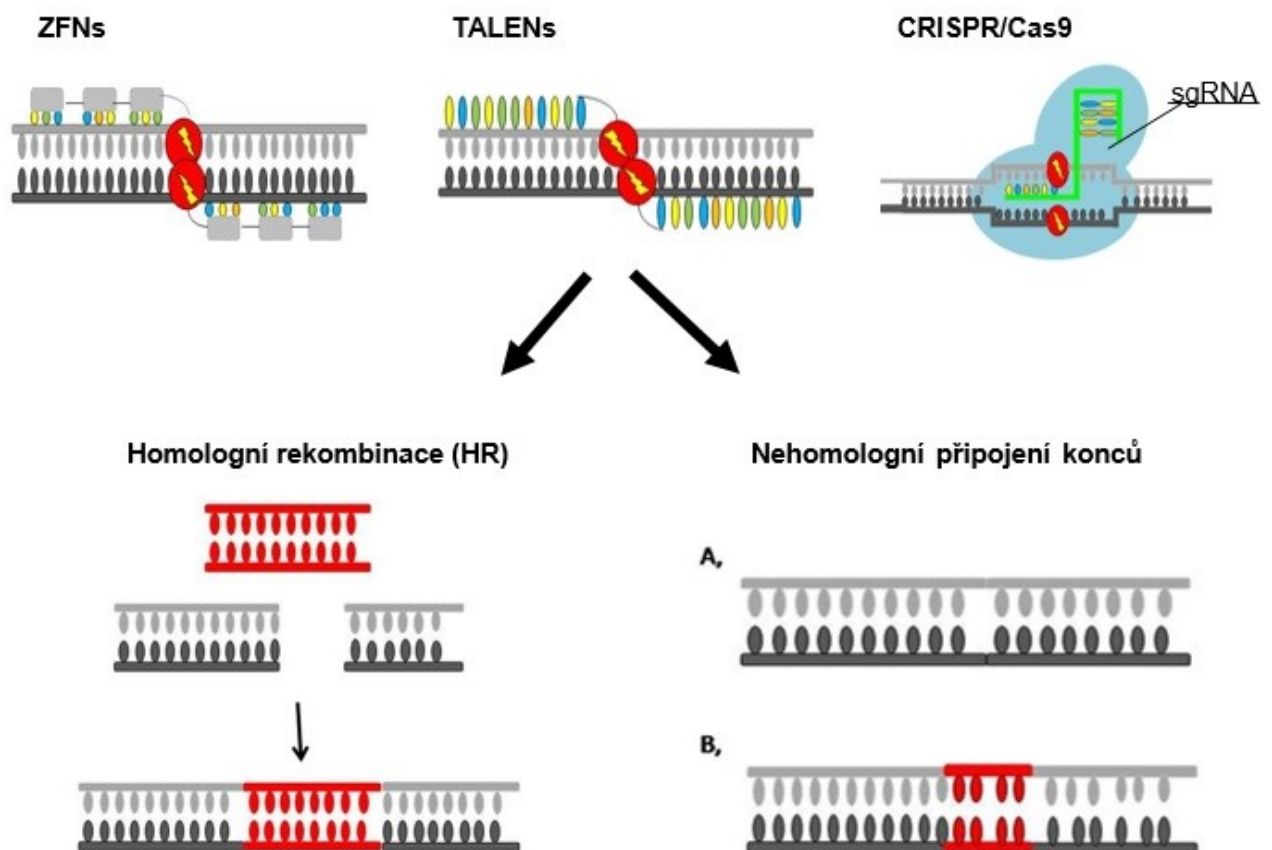
5.1 Homologní rekombinace (HR) a nehomologní připojování konců (NHEJ)

Jak již bylo zmíněno, mechanismus připravovaných nukleáz je vždy na obdobném principu. Výsledkem těchto nukleáz jsou vždy cílené DSBs, které se následně opravují pomocí dvou různých mechanismů. Pokud by buňka vzniklý defekt neopravila, mohla by sama zahynout. Proto v jádře dojde k homologní rekombinaci (HR) za předpokladu, že se zde nachází určitý

úsek DNA, který se může navázat na místo štěpení. Jestliže v jádře není žádná taková část DNA, využije se nehomologního připojení konců (NHEJ).

Nejčastějším výsledkem opravy je NHEJ. Většinou v cílené oblasti DSBs vznikne delece nebo inserce několika nukleotidů. Problém nastává v okamžiku, kdy se místo stříhu nachází uprostřed kódovací části DNA. Poté dochází k porušení exprese genu a nebo k zastavení jeho funkce. V dané oblasti může tedy dojít k mutacím nebo k tzv. „knockoutu“. NHEJ má pro buňku zcela zásadní význam. Může nastat v jakékoliv fázi buněčného cyklu a je mnohonásobně rychlejší než homologní rekombinace. Například u lidských buněk je NHEJ častěji využíváno než HR (Mao, Z. Bozzella, M. Seluanov, A. Gorbunova, 2009).

Na druhé straně je HR mnohem účinnější. Buňka opraví své poškození v DNA, které bylo způsobeno vytvořenými nukleázami, pomocí homologního templátu DNA. Musí to být ovšem pro ni výhodnější než opravit zlom pomocí NHEJ. Proto je třeba vpravit do jádra větší množství DNA templátu. S tím souvisí také princip knock-in, kdy se vymění informace za informaci z *wild type* DNA. Při HR může docházet také ke „crossing overu“, což má za následek výměnu až několika kb dlouhých úseků. Toho se využívá v genetickém inženýrství, kdy je buňce poskytnut templát DNA, který je potřeba začlenit (Hoshijima K, Juryne M.J., 2016).



Obr.3: Oprava dvouřetězcového zlomu (DSBs) způsobené specifickými endonukleázami. Připravované nukleázy ZNFs a TALENs mají připojenou FokI endonukleázu, které vytváří DSBs. Heterodimerická připojovací doména ZNFs se váže pomocí 3bp na cílovou sekvenci DNA. Vazebná doména TALENs obsahuje 33-35 aminokyselin, kdy na 12. a 13. místě je nejvyšší specifita nukleázy. Dalším typem je CRISPR, který využívá jako endonukleázu Cas 9. Cas9 vytváří společně s sgRNA, která je složená z crRNA a tracrRNA, komplex napojující se na cílovou sekvenci DNA. Místo sestřihu je určeno pomocí PAM sekvence přítomné na DNA. Po DSBs dochází k opravě DNA, a to dvěma cestami. Buďto se připojí nehomologní konce (NHEJ), kde často vznikají inserce nebo delece, nebo dojde k homologní rekombinaci (HR). K opravě pomocí HR je zapotřebí homologní templát DNA, který bude moci být připojen.

5.2 Off-target

Při konstrukci jednotlivých nástrojů ke genomové editaci je nutno dbát nejen na jejich účinnost, ale také na jejich specifitu. Skvělým výsledkům konstruovaných nukleáz, které jsou používány v genomovém inženýrství, brání off-target aktivita. Nukleáza Cas9 vytváří komplex s sgRNA, kterou tvoří 20 nukleotidů komplementárních k cílové sekvenci DNA. Za sekvenci nukleotidů sgRNA se napojuje PAM motiv, sestavený z NGG sekvence, kdy N představuje libovolný nukleotid (Cong et al., 2013). U systému CRISPR/Cas9 bylo zjištěno, že nezávisle na 3' nebo 5' konci cílové sekvence nedokáže rozpoznat jednonukleotidové záměny. I vyšší záměna nukleotidů, od 3 do 5 bp, může způsobit mimocílové štěpení a tím dochází ke snížení jejich specifity. Vyřešení problému off-target efektu je velmi důležité pro další výzkum a terapeutickou aplikaci (Fu et al., 2013).

Off-target aktivita se týká i ZNFs a TALENs, ale pouze v omezené míře. Je to dáno tím, že CRISPR/Cas9 funguje jako monomer, zatímco ostatní fungují jako heterodimery (Miller et al., 2007). Dále zde hraje roli také původ nukleáz. Systém CRISPR/Cas9 se přirozeně nachází u prokaryot, a proto je nejspíše jejich specifita omezena. ZNFs i TALENs se přirozeně nachází u eukaryotických buněk a mohou se připojovat i na sekvence delší 30 nukleotidů. Bylo ovšem objeveno, že mimocílové štěpení u CRISPR/Cas9 je ovlivněno jak složením nukleotidů, tak strukturou guideRNA. Dále je při pokusech zapotřebí vybírat takové cílové místo, aby se stejný úsek nevyskytoval jinde v genomu a nebyla zde zvýšená pravděpodobnost off-target aktivity (Y. Kim et al., 2013) (Cho et al., 2013).

6 VYUŽITÍ CRISPR/CAS9 SYSTÉMU

Díky připravovaným endonukleázám dochází k vytvoření transgenních živočichů. Pro tvorbu velkých zvířecích modelů se dnes čím dál častěji používá CRISPR/Cas9, který má oproti

ostatním programovaným nukleázám několik výhod. Mezi jeho největší výhody patří snadná manipulace a jednoduchost v přípravě. Endonukleáza Cas9 vytváří na DNA dvouřetězcové zlomy, které jsou následně opraveny. V dobře prozkoumané buňce se může záměrně inaktivovat určitý gen. Zajistí se to tím, že v místě stříhu dojde k NHEJ. Pokud je gen vyřazen již v zárodku, vytvoří se transgenní zvíře s genovým knockoutem (KO). Díky tomu můžeme získat přehled o tom, jaký protein daný gen zastupuje. Následně nám fenotyp zvířete objasní, jaký je i jeho význam.

Knock – in (KI) u živých organismů představuje vmezeření cizorodé DNA do DNA hostitele, kdy se buďto nahradí původní informace genu nebo se vloží zcela nový gen. KI je specifický v tom, že inserce genu je přesně dána díky specifickým nukleázám. Aby buňka opravila zlom pomocí homologní rekombinace, je třeba ji nabídnout geny vhodné k vmezeření. Tato metoda má velkou výhodu. Lze díky ní vytvořit transgenní zvíře s geny typickými pro jiný druh. Tím může být posunuta oblast výzkumu různých onemocnění.

Závěr práce se zaměřuje na tvorbu transgenních zvířat za pomoci využití CRISPR/Cas9 systému, který je nejnovějším tématem v oblasti genomové editaci.

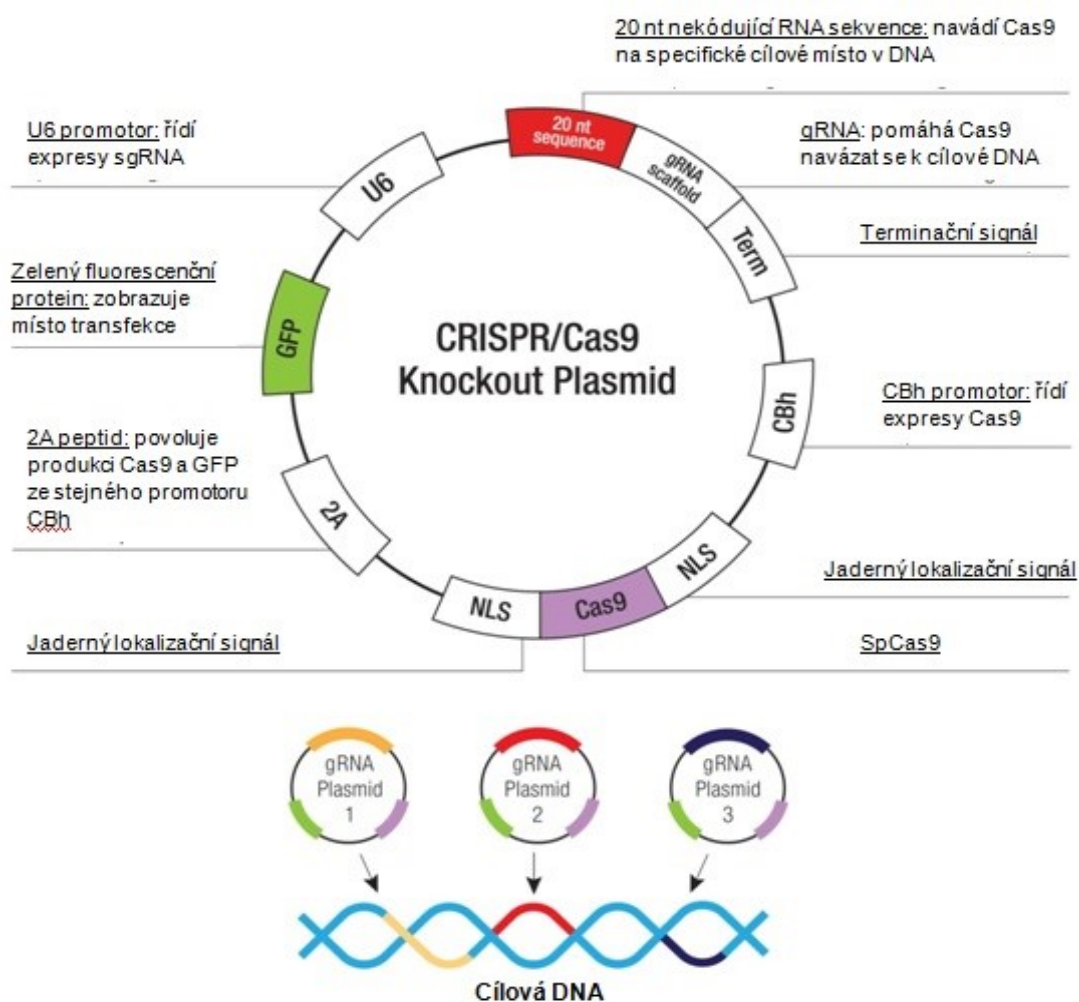
6.1 Příprava endonukleázy

Příprava CRISPR/Cas9 systému je stejná pro živočichy s knock – out (KO) i knock – in (KI) geny. Rozdílem je, že při KI je třeba dodat také templát, který bude následně do DNA recipienta zabudován. Díky CRISPR/Cas9 systému lze zcela přesně zacílit vybraný gen. Cas9 endonukleáza je univerzální, a proto ji lze využít i pro různé experimenty. Zcela zásadní je připravit sgRNA, která Cas9 navede na určené místo ve zvolené DNA, aby mohlo dojít k cílenému DSB. Díky veškerým výhodám je dnes CRISPR/Cas9 jedním z nejvíce diskutovaných témat. Lze ho použít jak na přímou mikroinjekci do jádra zygoty, tak i na úpravu jádra somatické buňky, které je následně přeneseno. Úspěšnost pokusů dává velké možnosti ve využití pro tvorbu velkých transgenních hospodářských zvířat.

Nejdříve je potřeba si dobře rozmyslet jednotlivé kroky vedoucí k výsledkům pokusu. Zaprvé je nutné vědět, do jakých buněk bude endonukleáza vpravena. Dále je potřeba znát cílovou sekvenci DNA. Danou sekvenci je třeba vybrat s určitým přesahem, abychom mohli následně shodnou sgRNA počítačově designovat. Program v počítači umí zvolit takovou sekvenci, aby se předešlo možným homologním sekvencím, které by mohly způsobovat nežádoucí off-target. Po určení cílové sekvence je třeba vytvořit vektor, který ponese naklonované oligonukleotidy sgRNA. Může jít například o plasmid (www.addgene.org) nebo o PCR amplikon. Ve vektoru je dále obsažena Cas9 nukleáza, primer a také G-C páry bází (Ran et al., 2013). Jeho nedílnou součástí je zvolená cílová sekvence, která bude v Cas9 komplexu

zastupovat složku crRNA a trRNA spojující všechny části komplexu. Je celá řada typů vektoru, lišících se v jednotlivých částech, ale základ musí být vždy stejný (OriGene, 2017). Připravený plasmid je vpraven do jádra buňky. Zde je přepsán do RNA, aby mohl vykonávat svojí funkci.

Zda došlo ke genomové modifikaci lze zjistit přidáním zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) do cílové sekvence DNA. Jedná se o přírodní protein pocházející z medúzy *Aequorea victoria*. Absorbuje světlo o vlnové délce modrého světla (395 nm - 475 nm) a emituje světlo zelené (Prasher, Eckenrode, Ward, Prendergast & Cormier, 1992). Gen pro GFP lze vložit do jakéhokoli živého organismu. Jeho fluorescencí se dokazuje úspěšnost pokusu, kdy lze detekovat, ve kterých buňkách došlo k vložení templátu při KI experimentech (M. Wu et al., 2016).



Obr. 4: Přenosový vektor pro CRISPR/Cas9. Většina plazmidů se skládá z více sgRNA, aby byla zajištěna účinnost a specifita. Přesné složení plazmidu se může lišit podle typu (upraveno z SCBT, 2016).

6.2 Příklady Knock – out (KO)

Jedním z nejčastějších knock – out genů je myostatin (Mstn). Jedná se o negativní regulátor svalstva u savců (Guo et al., 2016) (Lv et al., 2016) (Ni et al., 2014) (Zhao et al., 2015). Mutace v tomto genu způsobuje nadměrnou produkci svalové hmoty v organismu a může se přirozeně vyskytovat u člověka nebo dobytka. U ostatních savců lze Mstn deaktivovat pomocí připravovaných endonukleáz jako je CRISPR/Cas9 systém. Při Mstn KO zvířat dojde ke zvětšení svalové hmoty a jde tedy o žádoucí mutaci. Přímým mikroinjekováním do zygoty lze účinně získat transgenní organismus. Bylo prokázáno, že pro vyřazení Mstn genu je efektivní využít dvojí sgRNA u endonukleázy Cas9. U králíků se mohou projevy také neblaze ukázat na extrémně zvětšeném jazyku, což může u některých jedinců způsobovat dokonce i úmrtí (Guo et al., 2016). Bylo taktéž dokázáno, že danou mutaci je možné přenést i do další generace. Díky možnosti přenosu mutací do dalších generací by se králíci mohli stát důležitým modelem pro různá svalová onemocnění (Lv et al., 2016). U modelu koz bylo obdobně dokázáno, že použitím CRISPR/Cas9 je vysoká pravděpodobnost úspěchu pro KO Mstn genu ve fibroblastech (9 % - 70 %). Z vytvořené kolonie těchto fibroblastů byla vybrána jádra s mutací. Následně byla použita při technice SCNT. Úspěšnost byla 20%, kdy se 5 z 9 transgenních kůzlat narodila se všemi alelami mutantními. SCNT je výhodné díky tomu, že již dopředu dokážeme určit buňky s mutací (Ni et al., 2014).

Knock – out genu je možné provést v různých oblastech DNA. Tak jak lze provést KO Mstn genu, tak lze u prasat vyřadit z funkce gen pro vWF protein a modelovat tak onemocnění Willebrand, u kterého dochází k častému krvácení (Ruggeri & Zimmerman, 1987). Pomocí sgRNA, homologní k exonu 5 genu pro vWF, a Cas9 lze vytvořit mutaci v dané oblasti. Při mikroinjekování CRISPR/Cas9 došlo u prasat k vysoké úspěšnosti pokusu (63 %), která byla ještě podpořena malým toxickým účinkem na tvořící se embryo. CRISPR/Cas9 dokáže vytvořit bílelické mutace, čímž dojde ke změně v obou alelách daného genu (Lv et al., 2016) (Ni et al., 2014). Za použití techniky Western blot analýzy bylo poté zjištěno, že při monoalelické mutaci dochází v plicích ke snížené expresi proteinu vWF. Projevy bílelické mutace jsou velmi podobné těm lidským s poruchou vWF genu při Willebrand onemocnění, a tedy celkovému projevu choroby (Hai, Teng, Guo, Li & Zhou, 2014).

6.3 Příklady Knock – in (KI)

Pokusy na velkých zvířecích modelech jsou všeobecně velmi náročné, speciálně na hovězím dobytku (Renard et al., 2002). Roku 2015 se týmu vědců povedlo uskutečnit pokus za účelem vytvoření transgenního embrya skotu s vmezeřenou DNA do lokusu NANOG za pomoci CRISPR/Cas9. V připraveném plasmidu byla obsažena homologní sekvence k cílovému místu NANOG oblasti DNA společně s částí, která měla být začleněna. Jednalo

se o transgen EF1a–eGFP–IRES–Puro. Bylo zjištěno ideální množství mikroinjekování plasmidů, tedy 20 ng/μL sgRNA společně s 10 ng/μL Cas9 mRNA tak, aby došlo k vytvoření transgenního embrya. Díky GFP se velmi snadno zjistila úspěšnost pokusu již ve stádiu 8 buněk. Tento pokus dává velké naděje v možnosti využívání hovězího dobytka jako modelu pro genovou manipulaci (Heo et al., 2015).

Další úspěšný příklad genového KI byla tvorba prasete s lidským albuminem s možností následného využití u lidí. Vědci doufali, že po tomto úspěchu dojde k využívání velkých zvířecích modelů na výrobu biomedicínských produktů. Při experimentu byl do lokusu Albumin (Alb) prasete vmezeřen produkt z plazmidu obsahující lidský Alb CDS a SV 40 signální sekvence, pro přepravu plazmidu do jádra. Tento plazmid byl společně s vektorem nesoucím Cas9 a sgRNA mikroinjekován přímo do zygoty. Množství vytvořeného lidského proteinu albumin závisí na tom, zda byl KI úspěšný na jedné či dvou alelách. U heterozygotního zvířete dochází k výrazně menší produkci než u zvířete homozygotního. Tuto mutaci genu lze přenést do další generace, tedy do F1 generace (Peng et al., 2015).

KI genu se také podařilo u ovcí. Do oblasti ROSA26 v DNA jim byl vmezeřen gen za použití CRISPR/Cas9 systému. Locus ROSA26 je unikátní v tom, že pokud zde dojde k přidání jiného genu, neovlivní se tím exprese žádné jiné oblasti. Další výhodou je, že se jedná o poměrně velký úsek, kam může být potencionálně vmezeřen gen. Díky tomuto pokusu je dnes již známo, že při využití CRISPR/Cas9 lze tuto sekvenční využívat pro tvorbu transgenní ovce (Friedrich & Soriano, 1991) (M. Wu et al., 2016).

7 ZÁVĚR

Dnes jsou již zcela běžně využívané programované nukleázy u myších modelů. U velkých zvířecích modelů se jejich využití zatím stále zdokonaluje tak, aby se zamezilo velkému počtu problémů s jejich použitím. Každá z endonukleáz má svojí určitou specifitu a své vlastnosti. Vždy je nutné si dopředu rozmyslet jednotlivé kroky pokusu, aby se vyhodnotil nejlepší možný postup k tvorbě požadované změny. Programované nukleázy ZFNs a TALENs jsou dnes velmi často nahrazovány novějším systémem CRISPR/Cas9. Jeho největší výhody spočívají v jednoduchosti přípravy a nízkých nákladech. Velmi dobře se také osvědčil při tvorbě velkých zvířecích modelů. Jeho nevýhoda ovšem spočívá ve větší míře off-target aktivity, která je známá u všech dostupných nukleáz. Dochází při ní ke špatnému zaměření cílové sekvenční. Pokud k tomu dojde, je zde velká pravděpodobnost, že dojde k DSBs v životně důležitém genu pro buňku nebo dojde k nežádoucím změnám. Dnes je ovšem vynaloženo velké úsilí na snížení počtu těchto off-target aktivit díky jedinečným cílovým sekvencím se zcela přesnými vazebnými doménami.

K vytvoření velkých zvířecích modelů lze programované endonukleázy přímo mikroinjekovat do zygoty nebo lze pomocí nich upravit somatické jádro, které je následně přeneseno do enukleovaného oocyty. Novější technika upravuje pomocí nukleáz spermatogonie. Z nich vzniklé spermie nesou námi požadovanou změnu, kterou přenesou do embrya. Tato technika se u velkých zvířat osvědčila, ale stále je potřeba objasnit několik problematických otázek. Nejpoužívanější technikou je stále SCNT, přestože se jedná o velmi náročnou metodu i z hlediska časového. Mikroinjekování do zygoty je sice mnohem rychlejší, ale je zde vyšší riziko tvorby chimérních zvířat. Proto je vždy důležité promyslet pro a proti u jednotlivých technik.

Následná vytvořená embrya mohou mít KO nebo KI geny. U velkých zvířecích modelů byl teprve nedávno proveden KI genů. Vmezeření genu je velmi náročné, protože DNA hospodářských zvířat jen velmi neochotně opravuje DSBs pomocí homologní rekombinace. Přesto se řada výzkumů snaží vytvořit ideální kombinaci endonukleáz a templátu DNA s novou informací. Největším úspěchem pokusu je, pokud je daný transgen přenesen i do další generace potomků. Tím se zvyšuje úspěšnost celého výzkumu, protože se nemusí vytvářet stále nová embrya *in vitro*.

U velkých zvířecích modelů musíme počítat i s dalšími omezeními. Tito savci nemají za svůj život tolik mláďat jako například myši. To je dáno také tím, že myš může mít mláďata až několikrát do roka. Díky signifikantním počtům v jednotlivých myších skupinách se zkvalitňují výsledky pokusů. Myší model je velmi snadné jak získat, tak také chovat, a proto jsou náklady na jejich výzkum, v porovnání s velkými zvířaty, nízké. Na druhou stranu je třeba si uvědomit, že myš je nedostatečný model pro možnost využití na lidech. Většinu klinických testů je lepší provádět právě na velkých zvířatech, která jsou v mnoha ohledech podobnější člověku, aby se předešlo nebezpečí s tím spojeným a zvýšila se účinnost léčby. Velké transgenní živočichy lze využívat také v zemědělských oborech či v ochraně životního prostředí. Proto je důležitý výzkum v rámci tvorby velkých zvířecích modelů.

8 SEZNAM LITERATURY

- * Akagi, S., Matsukawa, K., & Takahashi, S. (2014). Factors Affecting the Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos in Cattle. *J. Reprod. Dev.*, 60, 329–335. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4219988/pdf/jrd-60-329.pdf>
- Akagi, S., Takahashi, S., Adachi, N., Hasegawa, K., Sugawara, T., Tozuka, Y., ... Izaike, Y. (2003). *In Vitro* and *In Vivo* Developmental Potential of Nuclear Transfer Embryos Using Bovine Cumulus Cells Prepared in Four Different Conditions. *Cloning and Stem Cells*, 5(2), 101–108. <https://doi.org/10.1089/153623003322234696>
- Arber, W. (1965). Host-Controlled Modification of Bacteriophage. *Annual Review of Microbiology*, 19(1), 365–378. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.19.100165.002053>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Patrick Boyaval, Moineau, S., ... Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(March), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Berg, P., Baltimore, D., Brenner, S., Roblin, R. O., & Singer, M. F. (1975). Summary Statement of the Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules*, 72(6), 1981–1984.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., ... Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5959), 1509–12. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Buemo, C. P., Gambini, A., Moro, L. N., Hiriart, M. I., Fernández-Martín, R., Collas, P., & Salamone, D. F. (2016). Embryo aggregation in pig improves cloning efficiency and embryo quality. *PLoS ONE*, 11(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146390>
- Campbell, H. S., Mcwhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature ProQuest Nursing & Allied Health Source* Pg, 380(6569).
- ** CIRI. (2013). Retrieved April 16, 2017, from http://ciri.inserm.fr/les-equipes/toutes-nos-equipes/virus-enveloppes-vecteurs-et-reponses-innees/research/?doing_wp_cron=1492367911.4320490360260009765625
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Hsu, P. D., ... Marraffini, L. A. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>. Multiplex
- Ding, Q., Regan, S., Xia, Y., Oostrom, L., Cowan, C., & Musunuru, K. (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem*, 12(4), 393–394. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.006>. Enhanced
- Eyestone, W. (1994). Challenges and progress in the production of transgenic cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 6(5), 647. <https://doi.org/10.1071/RD9940647>
- Flisikowska, T., Thorey, I. S., Offner, S., Ros, F., Lifke, V., Zeitler, B., ... Platzer, J. (2011).

- Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021045>
- Friedrich, G., & Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & Development*, 5(9), 1513–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1653172>
- Fu, Y., Foden, J. a, Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, K., & Sander, J. D. (2013). High frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnol*, 31(9), 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>.High
- Göddel, D. V, Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., ... Riggs, A. D. (1979). Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 106–110. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.106>
- Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, a, Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., ... Forsberg, C. W. (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, 19(8), 741–745. <https://doi.org/10.1038/90788>
- Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., & Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12), 7380–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7380>
- Guillinger, J. P., Pattanayak, V., Reyon, D., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Joung, J. K., ... Orleans, N. (2015). Broad Specificity Profiling of TALENs Results in Engineered Nucleases With Improved DNA Cleavage Specificity. *Nat Methods*, 57(6), 742–768. <https://doi.org/10.1002/dev.21214>.Developmental
- Guo, R., Wan, Y., Xu, D., Cui, L., Deng, M., Zhang, G., ... Zhang, Y. (2016). Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 6(July), 29855. <https://doi.org/10.1038/srep29855>
- Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., & Zhou, Q. (2014). One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 24(3), 372–5. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.11>
- Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Wall, R. J., Bolt, D. J., Ebert, K. M., ... Brinster, R. L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315(6021), 680–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3892305>
- Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. Y. H., & Wu, C. W. (1983). Xenopus Transcription Factor- α Requires Zinc for Specific Binding to the 5s-Rna Gene. *Federation Proceedings*, 42(7), 1881.
- Heo, Y. T., Quan, X., Xu, Y. N., Baek, S., Choi, H., Kim, N.-H., & Kim, J. (2015). CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine-induced pluripotent cells. *Stem Cells and Development*, 24(3), 393–402. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0278>
- Hoshijima K, Juryneć M.J., G. D. J. (2016). Precise genome editing by homologous recombination, 8(5), 121–147. <https://doi.org/10.1002/aur.1474>.Replication
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., & Kim, J. (2013). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases, 132–141. <https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>.Freely

- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., ... Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 756–761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
- Irina A. Polejaeva*, Shu-Hung Chen*, Todd D. Vaught*, Raymond L. Page*, June Mullins*, Suyapa Ball*, Yifan Dai*, Jeremy Boone*, Shawn Walker*, David L. Ayares*, A. C. & K. H. S. C. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407. Retrieved from <http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6800/pdf/407086a0.pdf>
- Jackson, D. A., Symons, R. H., & Berg, P. (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(10), 2904–2909. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.10.2904>
- Jaenisch, R. (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(4), 1260–1264. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.4.1260>
- Jaenisch, R., & Mintz, B. (1974). Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), 1250–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1250>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(August), 816–822. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jødal, L., Nielsen, O. L., Afzelius, P., Alstrup, A. K. O., & Hansen, S. B. (2017). Blood perfusion in osteomyelitis studied with [15O]water PET in a juvenile porcine model. *EJNMMI Research*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13550-016-0251-2>
- Kato, Y., & Tsunoda, Y. (2011). Role of the donor nuclei in cloning efficiency: Can the ooplasm reprogram any nucleus? *International Journal of Developmental Biology*, 54(11–12), 1623–1629. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103203yk>
- Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), 1156–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Kim, Y., Kweon, J., Kim, A., Chon, J. K., Yoo, J. Y., Kim, H. J., ... Kim, J.-S. (2013). A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology*, 31(3), 251–258. <https://doi.org/10.1038/nbt.2517>
- Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 213. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-010909-095056>
- * Kues, W. A., & Niemann, H. (2011). Advances in farm animal transgenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(2), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.009>
- * Laible, G., Wei, J., & Wagner, S. (2015). Improving livestock for agriculture - technological

- progress from random transgenesis to precision genome editing heralds a new era. *Biotechnology Journal*, 10(1), 109–120. <https://doi.org/10.1002/biot.201400193>
- Lillico, S. G., Proudfoot, C., Carlson, D. F., Stverakova, D., Neil, C., Blain, C., ... Whitelaw, C. B. a. (2013). Live pigs produced from genome edited zygotes. *Scientific Reports*, 3, 2847. <https://doi.org/10.1038/srep02847>
- Lind, N. M., Moustgaard, A., Jelsing, J., Vajta, G., Cumming, P., & Hansen, A. K. (2007). The use of pigs in neuroscience: Modeling brain disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(5), 728–751. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.02.003>
- * Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., & Murray, N. E. (2014). Highlights of the DNA cutters: A short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 3–19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990>
- Loi, P., Iuso, D., Czernik, M., & Ogura, A. (2016). A New , Dynamic Era for Somatic Cell Nuclear Transfer ? <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.03.008>
- Lv, Q., Yuan, L., Deng, J., Chen, M., Wang, Y., Zeng, J., ... Lai, L. (2016). Efficient Generation of Myostatin Gene Mutated Rabbit by CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, 6, 25029. <https://doi.org/10.1038/srep25029>
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., Gorbunova, V. (2009). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *Discovery Medicine*, 8(40), 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.06.018>.Comparison
- Menchaca, A., Anegón, I., Whitelaw, C. B. A., Baldassarre, H., & Crispo, M. (2016). New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. *Theriogenology*, 86(1), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.028>
- Miary ellen jones. (1953). ALBRECHT KOSSEL, A BIOGRAPHICAL SKETCH**. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2599350/pdf/yjbm00317-0091.pdf>
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y.-L., Rupniewski, I., ... Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 25(7), 778–85. <https://doi.org/10.1038/nbt1319>
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959), 1501. <https://doi.org/10.1126/science.1178817>
- Moura, R. R., Melo, L. M., & Freitas, V. J. de F. (2011). Production of recombinant proteins in milk of transgenic and non-transgenic goats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5), 927–938. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000500010>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X., Regouski, M., Yang, M., ... Chen, C. (2014). Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*, 9(9), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106718>
- ** OriGene (2017). CRISPR/Cas9 Genome Editing Application Guide. Retrieved April 29, 2017, from http://www.origene.com/assets/documents/CRISPR-CAS9/CRISPR_manual.pdf
- Park, K.-E., Powell, A., Sandmaier, S. E. S., Kim, C.-M., Mileham, A., Donovan, D. M., & Telugu, B. P. (2017). Targeted gene knock-in by CRISPR/Cas ribonucleoproteins in

- porcine zygotes. *Scientific Reports*, 7(April 2016), 42458. <https://doi.org/10.1038/srep42458>
- Pavletich, N. P., & Pabo, C. (1991). Zinc Structure of a Recognition : Complex Zif268-DNA. *Advancement Of Science*, 252(5007), 809–817.
- Peng, J., Wang, Y., Jiang, J., Zhou, X., Song, L., Wang, L., ... Zhang, P. (2015). Production of Human Albumin in Pigs Through CRISPR/Cas9-Mediated Knockin of Human cDNA into Swine Albumin Locus in the Zygotes. *Scientific Reports*, 5(April), 16705. <https://doi.org/10.1038/srep16705>
- Phillips, K. A., Bales, K. L., Capitanio, J. P., Conley, A., Paul, W., Hart, B. A., ... Lou, M. (2014). Why Primate Models Matter, 76(9), 801–827. <https://doi.org/10.1002/ajp.22281>
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229–233. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-H](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-H)
- * Radick, G. (2015). Beyond the “Mendel-Fisher controversy.” *Science*, 350(6257).
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- * Rausova, P., Vochozkova, P., Vidinska, D., Hrnčiarova, E., Bohuslavova, B., Macakova, M., ... Motlik, J. (2017). Porcine Model of Huntington’ s disease. Huntington disease – Molecular Pathogenesis and current models – Book, doi: 10.5772/66353
- Renard, J. P., Zhou, Q., LeBourhis, D., Chavatte-Palmer, P., Hue, I., Heyman, Y., & Vignon, X. (2002). Nuclear transfer technologies: Between successes and doubts. *Theriogenology*, 57(1), 203–222. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00667-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00667-7)
- Ruggeri, Z., & Zimmerman, T. (1987). Blood. *Blood*, 71(3), 895–904.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., ... Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, 265(5596), 687–695. <https://doi.org/10.1038/265687a0>
- ** SCBT (Santa Cruz Biotechnology) (2016). Control CRISPR/Cas9 Plasmid. Retrieved April 29, 2017, from <https://www.scbt.com/scbt/product/control-crispr-cas9-plasmid>
- Segal, D. J., Dreier, B., Beerli, R. R., Barbas, C. F., & III. (1999). Toward controlling gene expression at will: selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 2758–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077584>
- Sheu, J., Beltzer, J., Fury, B., Wilczek, K., Tobin, S., Falconer, D., ... Bauer, G. (2015). Large-scale production of lentiviral vector in a closed system hollow fiber bioreactor. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 2(April), 15020. <https://doi.org/10.1038/mtm.2015.20>
- Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2015). Expanding the Biologist’s Toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular Cell*, 58(4), 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>
- * Swindle, M. M., Makin, A., Herron, A. J., Clubb, F. J., & Frazier, K. S. (2012). Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Veterinary Pathology*, 49(2),

344–356. <https://doi.org/10.1177/0300985811402846>

- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., ... Mitalipov, S. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 153(6), 1228–1238. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006>
- Thompson, S., Clarke, A. R., Pow, A. M., Hooper, M. L., & Melton, D. W. (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, 56(2), 313–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2912572>
- Watson, J., & Crick, F. C. (1953). MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
- Weiss, B., & Richardson, C. C. (1967). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid, I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from *Escherichia coli* infected with T4 bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(4), 1021–1028. <https://doi.org/10.1073/pnas.57.4.1021>
- Whitelaw, C. B. A., Radcliffe, P. A., Ritchie, W. A., Carlisle, A., Ellard, F. M., Pena, R. N., ... Mitrophanous, K. A. (2004). Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Letters*, 571(1–3), 233–236. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.076>
- Wu, M., Wei, C., Lian, Z., Liu, R., Zhu, C., Wang, H., ... Wang, C. (2016). Rosa26-targeted sheep gene knock-in via CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*, 6(April), 24360. <https://doi.org/10.1038/srep24360>
- Wu, Y., Zhou, H., Fan, X., Zhang, Y., Zhang, M., Wang, Y., ... Li, J. (2015). Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, 25(1), 67–79. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.160>
- Yamada, M., Chiara, L. De, & Seandel, M. (2016). Spermatogonial Stem Cells: Implications for Genetic Disorders and Prevention, 25(20), 1483–1494. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0210>
- Yun, S. P., Kim, D. H., Ryu, J. M., Park, J. H., Park, S. S., Jeon, J. H., ... Han, H. J. (2011). Magnetic resonance imaging evaluation of Yukatan minipig brains for neurotherapy applications. *Laboratory Animal Research*, 27(4), 309. <https://doi.org/10.5625/lar.2011.27.4.309>
- Zeng, W., Tang, L., Bondareva, A., Honaramooz, A., Tanco, V., Does, C., ... Dobrinski, I. (2013). Viral transduction of male germline stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*, 88(1), 27. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.104422>
- Zhao, L. H., Zhao, Y. H., Liang, H., Yun, T., Han, X. J., Zhang, M. L., ... Li, X. L. (2015). A promoter trap vector for knocking out bovine myostatin gene with high targeting efficiency. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 2750–2761. <https://doi.org/10.4238/2015.March.31.5>

* Převzato z review

** Internetový zdroj